

Efek Antiproliferasi dan induksi Cell Cycle Arrest Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) Terhadap Sel Fibroblast NIH3T3 Sebagai Kandidat Anti Keloid

By Nunuk Aries Nurulita

Efek Antiproliferasi dan induksi Cell Cycle Arrest Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) Terhadap Sel Fibroblast NIH3T3 Sebagai Kandidat Anti Keloid

Nunuk Aries Nurulita^{1*}, Elza Sundhani¹, Nur Fina Mafazah¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto INDONESIA

*Email korespondensi: nunuknurulita@yahoo.com

ABSTRAK

Latar belakang: keloid merupakan jaringan parut yang tumbuh secara abnormal yang biasanya akan muncul pada penyembuhan luka yang tidak sempurna. Keloid lebih sering terjadi pada orang yang berkulit gelap dengan angka kejadian 4,5-16%. Penyebab munculnya keloid adalah proliferasi sel fibroblas yang abnormal. Daun jambu biji mengandung quersetin dan asam oleonolat yang diduga mempunyai potensi sebagai anti keloid.

Tujuan: penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi ekstrak daun jambu biji sebagai anti keloid melalui penentuan efek sitotoksik, antiproliferasi dan induksi penghambatan pada siklus sel.

Metode: pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol daun jambu biji. Uji sitotoksitas dan penentuan kinetika proliferasi sel fibroblast, NIH3T3 dilakukan dengan metode MTT. Efek modulasi terhadap siklus sel ditentukan dengan metode flowsitometri.

Hasil penelitian: uji sitotoksitas dengan variasi konsentrasi ekstrak (0-500 ug/mL) menunjukkan efek sitotoksik yang sedang (IC₅₀ 268 µg/mL). Pengujian kinetika proliferasi dengan konsentrasi 33, 67 dan 134 ug/mL ekstrak dengan konsentrasi 134 ug/mL menunjukkan penghambatan kinetika proliferasi terbesar. Hasil uji flowsitometri menunjukkan ekstrak jambu biji menyebabkan akumulasi sel pada fase G₀/G₁.

Kesimpulan: ekstrak jambu biji mempunyai potensi sitotoksik sedang dan mampu menekan laju proliferasi sel fibroblast melalui induksi penghambatan siklus sel pada fase G₀/G₁ dan induksi kematian sel. Ekstrak jambu biji mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai anti keloid.

Kata kunci: antikeloid, antiproliferasi, ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava*), sel fibroblast NIH3T3, siklus sel

PENDAHULUAN

Keloid merupakan jaringan parut abnormal yang sering dijumpai dalam proses penyembuhan luka. Pertumbuhan jaringan tersebut disebabkan oleh sintesis dan deposisi tidak terkontrol dari kolagen di dermis (Sukasah, 2007). Kasus keloid lebih sering terjadi pada orang yang berkulit gelap dengan angka kejadian sebesar 4,5-16% dan umumnya terjadi

pada usia 10 sampai 30 tahun (Alaster *et al.*, 2003).

Proses penyembuhan luka melalui 4 fase yaitu: fase hemostatis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi (Orsted *et al.*, 2011). Keloid muncul pada fase proliferasi dalam proses penyembuhan luka. Sel fibroblas dan myofibroblasts akan memicu produksi yang berlebih protein matriks ekstraselular. Sel fibroblas

bersama sel keratinosit dan mast berproliferasi memproduksi kolagen yang sangat berlebih dan membuat matriks ekstraselular menumpuk di bawah dermis (Ye *et al.*, 2015).

Pengobatan keloid dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya dengan radiasi, radioterapi intersitiasial, triamsinolon, 5-fluorourasil, bleomicin, interferon alfa, cryotherapy, pemberian silikon gel, terapi tekanan, laser dan metotrexat (Kakar *et al.*, 2003). Pengobatan yang telah dilakukan belum efektif. Beberapa penelitian juga telah membuktikan secara invitro dan invivo beberapa senyawa dari tanaman mempunyai aktifitas antikeloid antara lain quercetin dan asam oleanolat. Kedua senyawa tersebut dapat menghambat ekspresi mRNA TGF- 1, MMP-1, TIMP-1, dan P311 dan mengurangi produksi protein TGF- 1 dan kolagen tipe I dan III yang berperan penting dalam pembentukan keloid (Ye *et al.*, 2015). Daun jambu biji mengandung minyak atsiri, flavonoid, terpenoid dan saponin (Zakaria dan Mohd, 1994; Li *et al.*, 1999). Asam oleanolat juga telah diisolasi dari daun jambu biji (Arina dan Danno, 2002). Flavonoid yang terkandung dalam daun jambu biji adalah myricetin, quercetin, luteolin dan kaempferol (Vargas *et al.*, 2006). Penelitian ini menunjukkan ekstrak daun jambu biji (EDJ) mempunyai kemampuan menghambat kinetika proliferasi sel fibroblast dan menyebabkan sel terakumulasi pada fase G0/G1. EDJ mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen anti keloid.

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji, etanol 70%, EDJ, sel NIH3T3, DMEM (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 20% (v/v), penisillin-streptomisin 1 % (v/v) (Gibco), fungison 0,5%, MTT, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7, Trypsin-EDTA 0,25%,

RNAse, Propidium iodida. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perkolator, rotary evaporator, chamber, lempeng KLT, mikroskop inverted, 96-well plate, 6-well plate, inkubator CO₂, ELISA reader dan flowcytometer Guava.

Metode

Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia daun jambu biji diekstraksi etanol 70% dengan metode perkolasi, hingga diperoleh ekstrak cair yang kemudian diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental daun jambu biji (EDJ).

Identifikasi golongan senyawa kimia dengan KLT

Identifikasi kandungan senyawa ekstrak EDJ dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silika gel F254. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:aseton:asam formiat (10:2:1) untuk flavonoid dan n-heksan : etil asetat (7:3) untuk terpenoid, dengan menggunakan pereaksi semprot Sitroborat dan Anisaldehyd H₂SO₄.

Uji sitotoksik dan proliferasi dengan metode MTT

Sel fibroblast dengan konsentrasi 1×10^4 sel/sumuran (uji sitotoksitas) dan 5×10^3 sel/sumuran (uji proliferasi) diinkubasi selama 24 jam. Media dibuang dan dicuci PBS, kemudian ditambahkan sampel (0-1000 ug /mL) (uji sitotoksitas) 3 in (33, 76, 134 ug /mL) (uji proliferasi) diinkubasi kembali selama 24 jam (uji sitotoksitas) dan 24, 48 dan 72 jam (uji proliferasi), selanjutnya media kultur dibuang dan dicuci dengan PBS. Pada setiap sumuran ditambahkan MTT 0,5 mg/ml dan diinkubasi 4 jam, 37°C. Setiap sumuran ditambah 100 µl SDS 10% dalam 0,1 N HCL. Plate dibaca dengan ELISA reader 570 nm setelah

diinkubasi semalam dan digoyang dengan *shaker*.

Uji Siklus Sel dengan metode Flowsytometry

Sel dengan kepadatan 25×10^4 sel/sumuran (25×10^4 sel/1000 μ L MK) didistribusikan ke dalam sumuran 6-well plate dan diinkubasikan selama semalam dan diberi perlakuan EDJ (33 dan 134 μ g/mL). Setelah 24 jam inkubasi sel dipanen dan diberi reagen PI untuk selanjutnya dibaca menggunakan flowsitometer. Hasil pembacaan dianalisis menggunakan cell quest untuk mengetahui profil sebaran sel dalam siklus sel.

Analisis Hasil

Hasil pengukuran absorbansi digunakan untuk menghitung presentase kehidupan sel, untuk selanjutnya digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀

dengan⁸ menggunakan analisis probit dalam program SPSS 16.0 for windows .

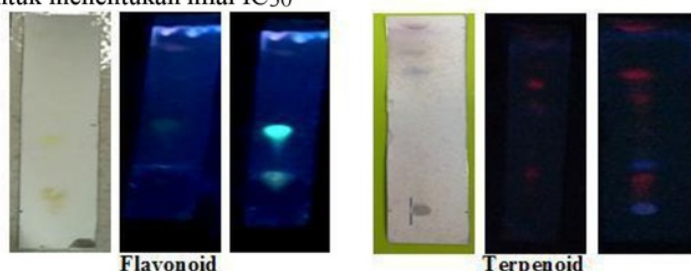
HASIL PENELITIAN

Ekstrak Daun Jambu Biji

Ekstrak yang diperoleh berupa ekstrak kental, berbau khas, berwarna hijau kecoklatan dan berasa pahit. Rendemen ekstrak yang diperoleh 23,66 %. Rendemen tersebut memenuhi persyaratan yang menyatakan rendemen ekstrak kental daun jambu biji lebih dari 12,3 % (Depkes RI, 2008).

Hasil Uji Identifikasi Kandungan Golongan Senyawa Kimia Ekstrak Daun Jambu Biji (Psidium guajava)

Hasil uji identifikasi senyawa terpenoid dengan KLT menunjukkan EDJ mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid (Gambar 1 dan Tabel 1).



Gambar 1. Identifikasi kandungan golongan senyawa kimia ED⁶ dengan metode KLT. Kandungan golongan senyawa EDJ diamati langsung, setelah disemprot dengan reagen semprot dan di bawah UV 366 nm (gambar kiri ke kanan).

Tabel 1. Identifikasi kandungan golongan senyawa dengan metode KLT.

Kandungan kimia		Sinar Tampak		UV 366		Hasil
		Tanpa pereaksi semprot	Tambah pereaksi semprot	Tanpa pereaksi semprot	Tambah pereaksi semprot	
Flavonoid	sitroborat	-	Hijau	Hijau pudar	Hijau kekuningan	+
Terpenoid	anisaldehid asamsulfat	-	Ungu	Merah	Merahungu	+

Uji Sitotoksik Menggunakan Metode MTT

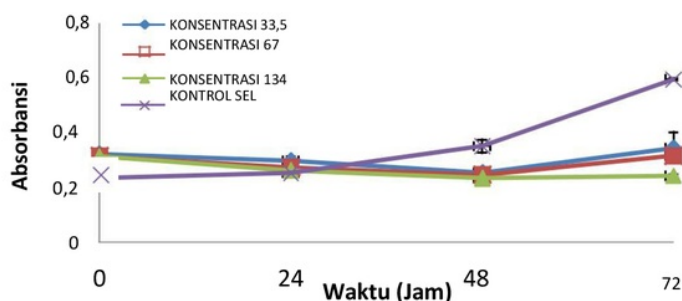
Nilai IC₅₀ yang didapat yaitu 268 µg/ml nilai IC₅₀ tersebut dianalisis menggunakan analisis probit. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika IC₅₀ < 1000 µg/ml (Adenan *et al.*, 2012).

Uji Proliferasi Pada Sel Fibroblas

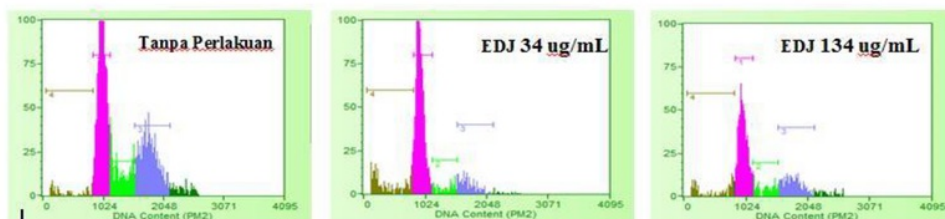
Hasil uji proliferasi menunjukkan EDJ menyebabkan penghambatan kinetika proliferasi sel fibroblast yang berbanding lurus dengan konsentrasi (Gambar 2).

Uji Siklus Sel Dengan Metode Flowcytometry

Hasil uji siklus sel menunjukkan EDJ menyebabkan penghambatan siklus sel pada fase Go/G1 (Gambar 3 dan Tabel 2).



Gambar 2. Penghambatan kinetika proliferasi EDJ pada sel fibroblast NIH3T3.



Gambar 3. Induksi akumulasi sel fibroblast pada fase G0/G1 setelah perlakuan EDJ. Sel fibroblast, 25×10^4 dan diberi perlakuan EDJ dan diukur DNA content-nya dengan flowsitometer.

Tabel 2. Akumulasi sel fibroblast pada setiap fase siklus sel setelah perlakuan EDJ.

Perlakuan	Fase sel (%)			
	Sub G1	G0/G1	S	G2/M
Kontrol sel	3,7	45,5	15	31,2
Konsentrasi 34 µg/ml	11,5	49,6	10,9	22,1
Konsentrasi 134 µg/ml	17,1	62,8	6,7	11,9

PEMBAHASAN

Kandungan senyawa kimia dari tanaman yang telah diteliti memiliki aktivitas anti keloid antara lain 10-Hydroxycamptothecin (HCPT), Angelica naphtha, Asiaticoside, Matrine, Quercetin,

Emodin, Resveratrol, Tan IIA, Curcumin, Dihydroartemisinin, Arteannuin, Panax notoginseng saponins (PNS), Oleanolic Acid, Hirudin dan Xiamenmycin (Ye *et al.*, 2015). Oleanolic Acid, dan quersetin dengan mekanisme menghambat ekspresi

mRNA TGF- 1, MMP-1, TIMP-1, and P311 dan mengurangi produksi protein TGF- 1 dan kolagen tipe I dan III (Ye *et al.*, 2015). Daun jambu biji mengandung 4 minyak atsiri dengan komponen utama α -pinene, β -pinene, limonene, mentol, terpenyl asetat, isopropil alkohol, longicyclene, caryophyllene, β -bisabolene, cineol, caryophyllene oksida, β -copanene, farnesene, humulene, selinene, dan cardinene (Zakaria dan Mohd, 1994; Li *et al.*, 1999). Flavonoid, saponin dan asam oleanolic telah diisolasi dari daun jambu biji (Arima dan Danno, 2002). Flavonoid yang terkandung dalam daun jambu biji antara lain myricetin (208,44 mg kg⁻¹), quercetin (2883,08 mg kg⁻¹), luteolin (51,22 mg kg⁻¹) dan kaempferol (97,25 mg kg⁻¹) (Vargas *et al.*, 2006). Penelitian ini juga mengkonfirmasi kandungan golongan senyawa yang diduga bertanggungjawab sebagai antikeloid, yaitu flavonoid dan terpenoid, dan terbukti EDJ positif mengandung kedua golongan senyawa tersebut.

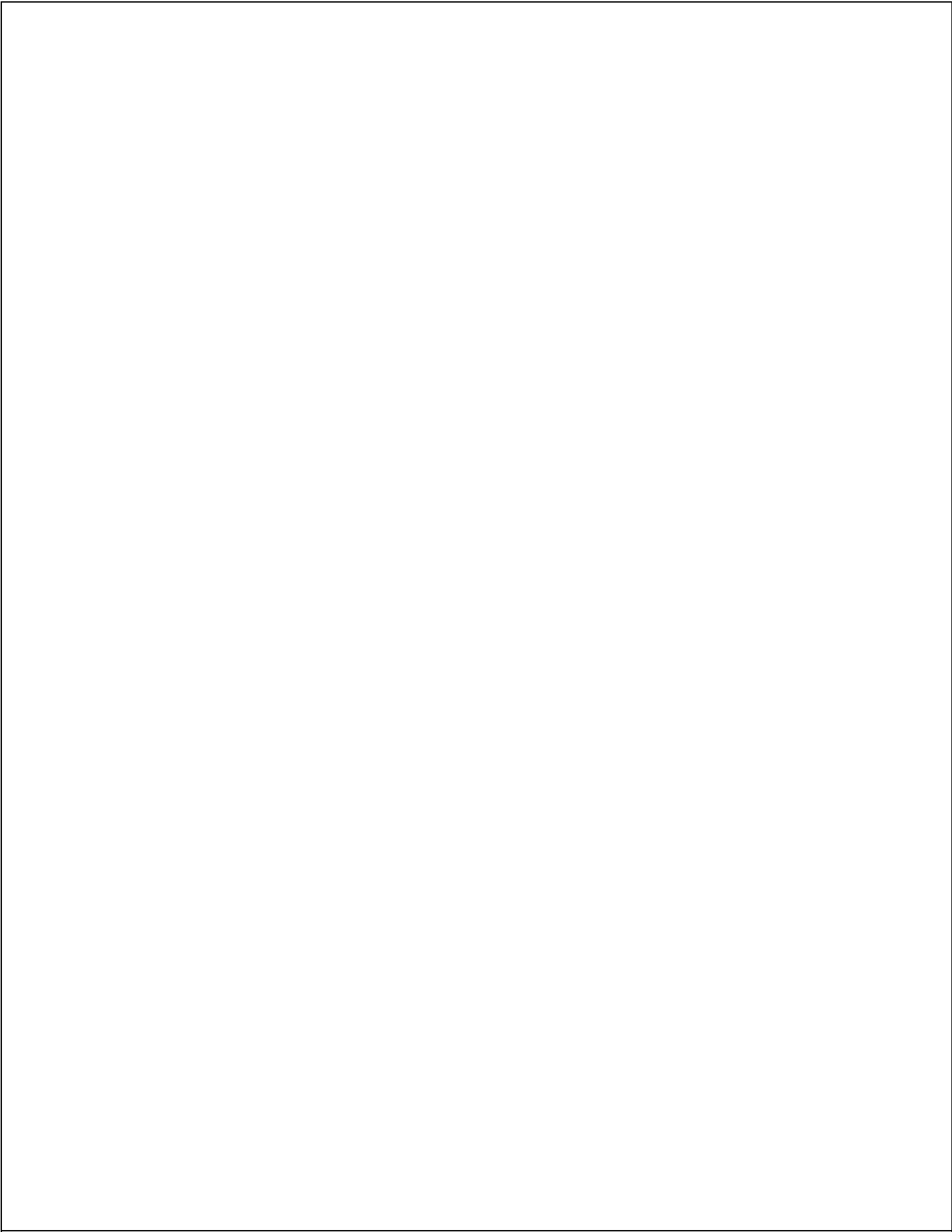
Ekstrak etanol daun jambu biji (EDJ) menyebabkan penurunan viabilitas sel yang berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi perlakuan. EDJ memiliki potensi ketoksikan yang sedang (268 μ g/ml). Hasil uji proliferasi menunjukkan EDJ dapat menghambat laju kinetika proliferasi berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak. Golongan senyawa flavonoid dan terpenoid mempunyai kemampuan menghambat ekspresi mRNA dan mengurangi produksi protein (Ye *et al.*, 2015) yang diduga berkorelasi dengan efek antiproliferatif dari ekstrak tersebut. Untuk mengetahui pengaruh penghambatan tersebut pada fase dalam siklus sel, dilakukan uji flositometri. EDJ dapat menyebabkan akumulasi sel pada fase G₀/G₁ (G₁ arrest) dan sub G₁. Perlakuan EDJ menyebabkan penghambatan pada fase awal siklus sel yaitu pada tahap persiapan dengan aktivitas utama sintesis protein yang digunakan untuk replikasi DNA

kromosom pada fase S. Selain itu EDJ juga dapat menyebabkan induksi kematian sel yang ditandai dengan semakin meningkatnya persentase sel pada sub G₁ yang menandakan sel kemungkinan besar mengalami fragmentasi DNA. Kematian sel yang ditandai dengan akumulasi pada sub G₁ diduga melalui mekanisme apoptosis.

Quercetin telah terbukti secara in vitro dapat mengurangi proliferasi pada fibroblas yang berasal dari bekas luka keloid dan mengubah jalur signaling intraselular dan sintesis kolagen (Ye *et al.*, 2015). Quercetin tidak hanya menghambat proliferasi fibroblast dan menyebabkan G₁ arrest, tetapi juga dapat menghambat kontraksi FPCL (TT *et al.*, 2003). Saulis *et al* (2002) telah membuktikan secara in vivo, mederma (senyawa aktif allium cepa, turunan kuersetin) mampu memperbaiki organisasi kolagen dan berpengaruh pada patofisiologi bekas luka hipertrofik. EDJ terbukti memiliki potensi menghambat pertumbuhan berlebihan sel fibroblast yang menyebabkan terbentuknya keloid. Efek tersebut diduga disebabkan karena kandungan flavonoid dan terpenoid dalam ekstrak tersebut.

KESIMPULAN

Ekstrak daun jambu biji (EDJ) mempunyai potensi sitotoksik sedang dan mampu menekan laju proliferasi sel fibroblast. EDJ menyebabkan induksi penghambatan siklus sel pada fase G₀/G₁ yang diduga akan mengarahkan kematian sel melalui apoptosis. Ekstrak jambu biji mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai anti keloid.



Efek Antiproliferasi dan induksi Cell Cycle Arrest Ekstrak Daun Jambu Biji (Psidium guajava) Terhadap Sel Fibroblast NIH3T3 Sebagai Kandidat Anti Keloid

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	media.neliti.com Internet	28 words — 2%
2	www.colpos.mx Internet	24 words — 1%
3	eprints.umm.ac.id Internet	19 words — 1%
4	Eun Hee Han, Yong Pil Hwang, Jae Ho Choi, Ji Hye Yang, Jong Kwon Seo, Young Chul Chung, Hye Gwang Jeong. "Psidium guajava extract inhibits thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production in human keratinocytes by inducing heme oxygenase-1 and blocking NF-κB and STAT1 activation", Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011 Crossref	18 words — 1%
5	kucingnakal.blogspot.com Internet	16 words — 1%
6	issuu.com Internet	10 words — 1%
7	etheses.uin-malang.ac.id Internet	9 words — 1%
8	id.123dok.com Internet	8 words — < 1%

9 Peranginangin, Jason Merari, Opstaria Saptarini, Erly Ismawati, Ryszal Aan Wihardy, and Rizky Fadly. "Effect of Steeped Black Tea (*Camellia sinensis* (L.) var. *assamica*) on Immunoglobulin Titer and Lymphocyte Proliferation in Responses to Hepatitis B Vaccine in Mice", *Procedia Chemistry*, 2014. 8 words — < 1%
Crossref

10 repository.ipb.ac.id 8 words — < 1%
Internet

EXCLUDE QUOTES OFF
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY OFF

EXCLUDE MATCHES OFF